



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **02122267 A**(43) Date of publication of application: **09.05.90**

(51) Int. Cl.

G01N 33/72
G01N 33/60(21) Application number: **63276387**(22) Date of filing: **01.11.88**(71) Applicant: **GREEN CROSS CORP:THE**(72) Inventor: **FUNAYAMA MASAHIRO**
TAKADA ASAMI
TSUBOUCHI MIHO
NAGATOMO MIDORI**(54) REAGENT KIT FOR DETERMINING HUMAN
HEMOGLOBIN AND METHOD FOR
DETERMINING HEMOGLOBIN BY USING THIS
KIT****(57) Abstract:**

PURPOSE: To allow the trace determination of the hemoglobin in plasma, serum and urine and the determination by use of an automatic spectrophotometer by using the reagent kit for determining the human hemoglobin.

CONSTITUTION: The reagent kit for determination consists of the reagent I: an aq. soln. contg. 3, 3', 5, 5'-tetramethyl benzidine and citric acid, the reagent II: an aq. soln. contg. strontium peroxide and Hb standard. The exactly determined hemoglobin is then

added to the plasma of a healthy person to dilute the plasma, by which the plasma contg. the hemoglobin at 10 to 100mg/dl concn. is obtd. The hemoglobin-contg. plasmas of the respective concns. are added and mixed at 10 μ l to and with 1ml coloring reagent prepd. by mixing of the reagent I and the reagent II at an equal ratio and after the reagents are incubated exactly for 10 minutes at 37°C, the absorbances at 650nm are measured by the automatic spectrophotometer with a self-blak as a contrast. A calibration curve is then formed. The hemolysis plasma decided to have 2100mg/dl hemo globin concn. is subjected to the similar operation and the hemoglobin concn. in the plasma is determined from the calibration curve.

COPYRIGHT: (C)1990,JPO&Japio

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-122267

⑤ Int. Cl.⁵G 01 N 33/72
33/60

識別記号

A 7055-2G
Z 7055-2G

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)5月9日

審査請求 未請求 請求項の数 10 (全9頁)

⑭ 発明の名称 ヘモグロビン定量試薬キット及びそれを用いるヘモグロビン定量方法

⑰ 特 願 昭63-276387

⑱ 出 願 昭63(1988)11月1日

⑲ 発 明 者 船 山 政 弘 大阪府大阪市都島区都島中通3丁目5番44号 株式会社ミドリ十字都島工場内

⑲ 発 明 者 高 田 麻 美 大阪府大阪市都島区都島中通3丁目5番44号 株式会社ミドリ十字都島工場内

⑲ 発 明 者 坪 内 美 保 大阪府大阪市都島区都島中通3丁目5番44号 株式会社ミドリ十字都島工場内

⑳ 出 願 人 株式会社ミドリ十字 大阪府大阪市中央区今橋1丁目3番3号

㉑ 代 理 人 弁理士 寺崎 孝一 外2名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

ヘモグロビン定量試薬キット及び
それを用いるヘモグロビン定量方法

2. 特許請求の範囲

1. (イ) 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン及びクエン酸を含む水溶液、ならびに
(ロ) 過酸化ストロンチウムを含む水溶液よりなる
ヒトヘモグロビン定量試薬キット。

2. キットが(ハ) ヒトヘモグロビンのスタンダード水溶液を更に含む請求項1記載のキット。

3. (イ) の水溶液が3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン20~30 mg/100 ml
及びクエン酸150~250 mg/100 mlの割合である請求項1記載のキット。

4. (ロ) の水溶液が過酸化ストロンチウムを60~90 mg/100 mlの割合で含む請求項1記載のキット。

5. (イ) 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン及びクエン酸を含む水溶液と(ロ) 過酸化ストロンチウムを含む水溶液とを用時混合し、混合液にヘモグロビンを含む検体を加え、反応発色させ、比色定量することからなるヘモグロビンの定量方法。

6. ヘモグロビンを含む検体がヒトの血漿、血清又は尿である請求項5記載の方法。

7. (イ) の水溶液と(ロ) の水溶液の混合物に2~4%の濃度の過酸化水素溶液を更に加える請求項5記載の方法。

8. 比色定量を、645~655 nm又は365~375 nmの波長における吸光度に基づいて行なう請求項5記載の方法。

9. 比色定量を自動分光光度計を用いることにより行なう請求項5記載の方法。

10. 比色定量を、1連の濃度にヘモグロビンを添加したヘモグロビン不含のスタンダード検体より得られた検量線に基づいて行なう請求項5記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は臨床検査領域のヘモグロビンの定量方法及びそれに用いる定量試薬キットに関し、更に詳しくは、テトラメチルベンジジンを酸化発色剤とする所謂カラー法によるヘモグロビンの定量に関する。

(背景技術)

血漿、血清及び尿中のヘモグロビン（以下Hbと略す）の量の変動は、血管内溶血の程度を知る上、また泌尿器の疾病を診断する上臨床上きわめて重要である。例えば近時開心術の補助手段として対外循環が比較的安全に行なわれる様になった。しかし、体外循環中、生体は非生理的条件下に置かれる為、様々な合併症を生じることがある。その中でも人工心肺を用いた体外循環により生じる溶血は、術後腎不全の主要な原因と考えられている。血漿中の遊離Hbの定量は体外循環時の溶血度を知る為の有効な検査法である。

Hb の臨床的測定、定量法は種々提案されかつ

いる。すなわち、この方法（以下シアンメト国際標準法という）は、 $4.5 \text{ g/dl} \sim 18.0 \text{ g/dl}$ のような比較的高濃度の Hb の定量には通ずるけれども、 4500 mg/dl 以下の濃度、例えば 100 mg/dl 以下のような低濃度の Hb の定量には不適であると推定できる。実際にシアンメト国際標準法で定量した高濃度の Hb 溶液を 0 及び 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg/dl の濃度に希釈したものを用いてシアンメト国際標準法で再定量、検量線を書くと、その検量線は直線にならない。つまり、この方法では $0 \sim 100 \text{ mg/dl}$ の濃度の Hb に対しては、正確な測定値が得られない。

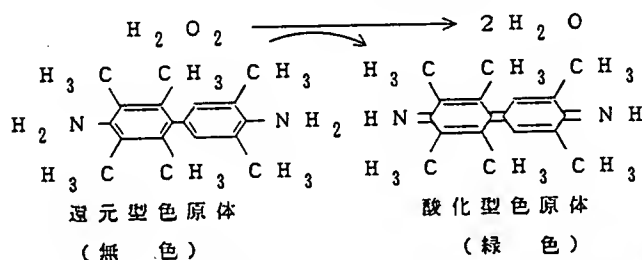
Hb は、過酸化水素を分解するペルオキシダーゼ様作用を有する。この作用を利用して元來無色のベンジジン化合物を過酸化水素を介して酸化して発色させる反応により Hb を比色定量することができる。この方法は従来微量の Hb の定量方法の主流であった。ベンジジンそのものの発癌性が指摘されて以来、発癌性のない 3, 3', 5,

実施されている。分光光度計を用い希釈試料を直接測定する方法は、操作は簡単であるが測定波長領域における他の血液成分例えばビリルビン、乳び、更には混濁の影響を受けやすく高値側へ誤差を生じ易い。

Hb はフェリシアン化カリウムで容易に酸化され、メトヘモグロビンになる。メトヘモグロビンは更にシアン化カリウムによってシアンメトヘモグロビン（赤褐色）になり、540～542 nm に吸収極大を示すので、この波長領域の吸光度を測定する事により比色定量する。この方法は1964年国際血液学会標準規格委員会から勧告された方法であって、フェリシアン化カリウム及びシアン化カリウムを含む溶液の発色原液とシアンメトヘモグロビン標準溶液とよりなるキットとして市販されている。市販品の説明書によると、標準溶液と発色溶液との反応による検量線は、吸光度（ y ）とヘモグロビン濃度（ x ）との間に、Hb 4.5 g/dl から18.0 g/dl までの実測において1:1の直線関係があることが示されて

5'-テトラメチルベンジジン（以下TMBと称す。）がこれに代った。これを本文においてカラー法と称する。

ベルオキシダーゼ様作用



発色を660nmで比色することによりHbを定量する(Medical Technology Vol.13.No.12. PP. 1264)。

カラー法を実施するのに次の試薬を用い、第1表の手順による。

〈試 案〉

- 1) TMB 試薬: TMB 0.1 g を 90% 酢酸溶液に溶解し、全量を 100 ml とする (4℃、3 週間安定)。
- 2) 過酸化水素水 1 : 30% 過酸化水素 0.5

m l を蒸留水 29.5 m l に加える (6~8 時間安定)。

3) 過酸化水素水 II : 30% 過酸化水素 0.1 m l を蒸留水 29.9 m l に加える (6~8 時間安定)。

4) 10% 酢酸溶液

5) H b スタンダード (濃度約 50 mg / d l の希釈溶液)

第 1 表

	サンプル	スタンダード	ブランク
血 漿	0.02 m l	0.02 m l	0.02 m l
過酸化水素水 I		1.0 m l	1.0 m l
		混和後 37℃ 10 分間加温	
H b スタンダード		0.02 m l	
過酸化水素水 II	1.0 m l		
TMB 試薬	1.0 m l ただちに添加しないと 発色が抑制される	1.0 m l	1.0 m l
	混和後、室温に 25 分間静置		

- 7 -

販売されているが、裸眼による呈色の有無による検査方法であって到底定量を目的としたものではない (マイルス・三共株式会社 : ヘマテスト II)。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は、血漿、血清及び尿中のヘモグロビンの微量定量を可能とし、しかも自動分光光度計の使用に適う定量用試薬キット及びそれを用いる方法を提供する。

本発明の H b 定量方法に用いる定量用試薬キットは、

試薬 I : TMB 及びクエン酸を含む水溶液

試薬 II : 過酸化ストロンチウムを含む水溶液及び

H b スタンダード : シアンメト国際標準法で正確に含量を定量した一定濃度の H b 水溶液

よりなる。

試薬 I に含まれるクエン酸の量は、

それを含む水溶液が必要量の TMB を溶解するに足ればよい。本発明の定量法において必要な T

	サンプル	スタンダード	ブランク
10% 酢酸溶液	10.0 m l	10.0 m l	10.0 m l
	20 分後自己ブランクを 0 として 660nm で比色		

$$Hb \text{ (mg / d l)} = \frac{A}{A_{st}} \times S_{c}$$

A : 試料の吸光度、A_{st} : スタンダードの吸光度、S_c : スタンダードの濃度。

もし高い感度を必要とする時は 10% 酢酸溶液を 1/2 フィット (f i t) にする。

ここに、TMB は、中性では殆ど水に解けないため、90% 酢酸溶液として用いているので強酸性を示し、また、この試薬の保存可能期間も極めて短い。また過酸化水素試薬は用時調製を必要とし、また、測定操作が繁雑であるため (検量線の作成と検体とでは測定操作が異なる)、この方法を自動分析器にかけるには問題がある。

また、過酸化水素の代りに過酸化ストロンチウムを用い、酢酸カルシウム及びクエン酸と共に TMB を固形剤として含む糞便中の潜血検査試薬も

- 8 -

MB の量は、実際上の微量の H b に対応する 0.2~0.3 mg / m l であるので、これを溶液に保つ量 1.5~2.5 mg / m l である。

かくして、試薬 I の水溶液は TMB 20~30 mg およびクエン酸 150~250 mg を水 (好ましくは精製水) 100 m l に溶解した後にフィルター (好ましくは 0.45 μ m 孔径) で濾過して得られる。また、試薬 II の水溶液は過酸化ストロンチウム 60~90 mg を水 (好ましくは精製水) 100 m l に溶解した後にフィルター (好ましくは 0.45 μ m 孔径) で濾過して得られる。両試薬とも各々遮光のもと冷蔵 (2~10℃) すれば最低 3 ヶ月の保存に耐え使用に供することができる。また、尿中の H b を測定するためには、2~4% 過酸化水素水溶液をキットに含むことが好ましい。

上記のキットを用い血漿、血清又は尿などの中の H b の微量定量は次のようにして行なう。

試薬 I 及び試薬 II を用時混合する。混合比としては、1 対 1 程度が好ましい。しかる後に H b を含む一定量の検体 (例えば、血清、血漿、尿等) を

添加して、10～37℃で一定時間（1～60分間程度）反応させる。さらに、特定波長（365～375nmあるいは645～655nm）における吸光度をブランクを対照として測定する。同様の操作により作成した検量線（ヘモグロビン濃度0～100mg/dl程度）から検体中のヘモグロビン濃度を求める。

検量線を作成するために用いられる検体に代る対象は、検体に相当する健康人の血漿、血清又は尿などに種々の濃度（～100mg/dl）にHbスタンダードを加えたものが用いられる。Hbスタンダードは高濃度のHbの水溶液であって、Hbはシアンメト国際標準法により正確にその含量を定量しておく。比色定量は、自動分光光度計により簡単に行なうことができる。

定量に用いる波長領域は予め次のようにして定める。

例えば、HITACHI UV-VISIBLE RECORDING SPECTROPHOTOMETER UV-240を用いて（1）健康人血漿、（2）ヒトヘモグロビン、（3）健康ヒト

血漿＋ヒトヘモグロビン及び（4）被検ヒト血漿（含ヘモグロビン）＋発色試薬の吸収曲線を描いた（各吸収曲線を第1図にまとめた。）

同様にして、

（5）健康人尿、（6）ヒトヘモグロビン、（7）健康人尿＋ヒトヘモグロビン、（8）被検ヒト尿（含ヘモグロビン）＋発色試薬の吸収曲線を描き、これらを第2図にまとめた。

以上に示した吸収曲線から血漿、血清、尿など中のヘモグロビンは共通して370nmまたは650nmで比色定量可能な事がわかる。

本発明のHb定量法は0～100mg/dlのHb微量領域で再現性よく、かつ自動分光光度計の使用を可能とする方法であって、これを非限定の実施例をもって更に説明する。実施例において使用された試薬は次の通りである。

試薬Ⅰ：クエン酸384mgおよびTMB52mgを精製水に溶解して全量を200mlとした後にフィルター（孔径0.45μm）で濾過する。

— 11 —

試薬Ⅱ：過酸化ストロンチウム154mgを精製水に溶解して全量200mlとした後にフィルター（孔径0.45μm）で濾過する。

実施例1

溶血していない健康人血漿に、シアンメト国際標準法により正確に定量したヘモグロビンを添加し、これを希釈して10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100mg/dlの濃度のヘモグロビン含有血漿を調製した、試薬Ⅰ及び試薬Ⅱの等量混合により調製した発色試薬1mlに各々の濃度のヘモグロビン含有血漿10μlを添加、混合し、37℃で正確に10分間インキュベートした後、自己ブランクを対照として自動分光光度計で650nmの吸光度を測定し、検量線（第3図）を作成した。シアンメト国際標準法によりヘモグロビン濃度を100mg/dl以下と判定された溶血血漿について同様の操作を行ない、650nmの吸光度を測定し、検量線から血漿中のヘモグロビン濃度を求めた。

— 12 —

実施例2

実施例1を繰返した。但し発色試薬1mlに各々の濃度のヘモグロビン含有血漿の添加量を100μlとした。得られた検量線を第4図に示す。

実施例3

健康人尿にシアンメト国際標準法により正確に定量したヘモグロビンを添加し、10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100mg/dlの濃度のヘモグロビン含有尿を調製した。試薬（Ⅰ）及び試薬（Ⅱ）の等量混合により調製した発色試薬1mlに各々の濃度のヘモグロビン含有尿100μlを添加、混合し、37℃で正確に10分間インキュベートした後、自己ブランクを対照として自動分光光度計で370nmの吸光度を測定し、検量線（第5図）を作成した。シアンメト国際標準法により、ヘモグロビン濃度100mg/dl以下と判定された血尿について同様の操作を行ない、370nmの吸光度を測定し、検量線から血尿中のヘモグロビン濃度を求め

た。

実施例 4

健康人尿にシアンメト国際標準法により正確に定量したヘモグロビン溶液を添加し、20、40、60、80、100 mg/dl の濃度のヘモグロビン含有尿を調製した。

試薬 (I) 及び試薬 (II) の等量混合により調製した発色試薬 1.9 ml に 3% H₂O₂ 溶液

100 μ l を添加し、更に各々の濃度のヘモグロビン含有尿 5 μ l を添加、混合し、37℃で正確に 10 分間インキュベートした後、自己ブランクを対照として自動分光光度計で 370 nm の吸光度を測定し、検量線 (第 6 図) を作成した。

シアンメト国際標準法により、ヘモグロビン濃度 100 mg/dl 以下と判定された血尿について同様の操作を行ない、370 nm の吸光度を測定し、検量線から血尿中のヘモグロビン濃度を求めた。

実施例 5

溶血してない健康人血漿にシアンメト国際標準法により正確に定量したヘモグロビンを添加し、

20、40、60、80、100 mg/dl の濃度のヘモグロビン含有血漿を調製した。試薬 (I) 及び試薬 (II) の等量混合により調製した発色試薬 2 ml に各々の濃度のヘモグロビン含有血漿 5 μ l を添加、混合し、37℃で正確に 10 分間インキュベートした後、自己ブランクを対照とし、370 nm の吸光度を測定し、検量線 (第 7 図) を作成した。シアンメト国際標準法によりヘモグロビン濃度 100 mg/dl 以下と判定された溶血血漿について同様の操作を行ない、370 nm の吸光度を測定し、検量線から溶血血漿中のヘモグロビン濃度を求めた。

4. 図面の簡単な説明

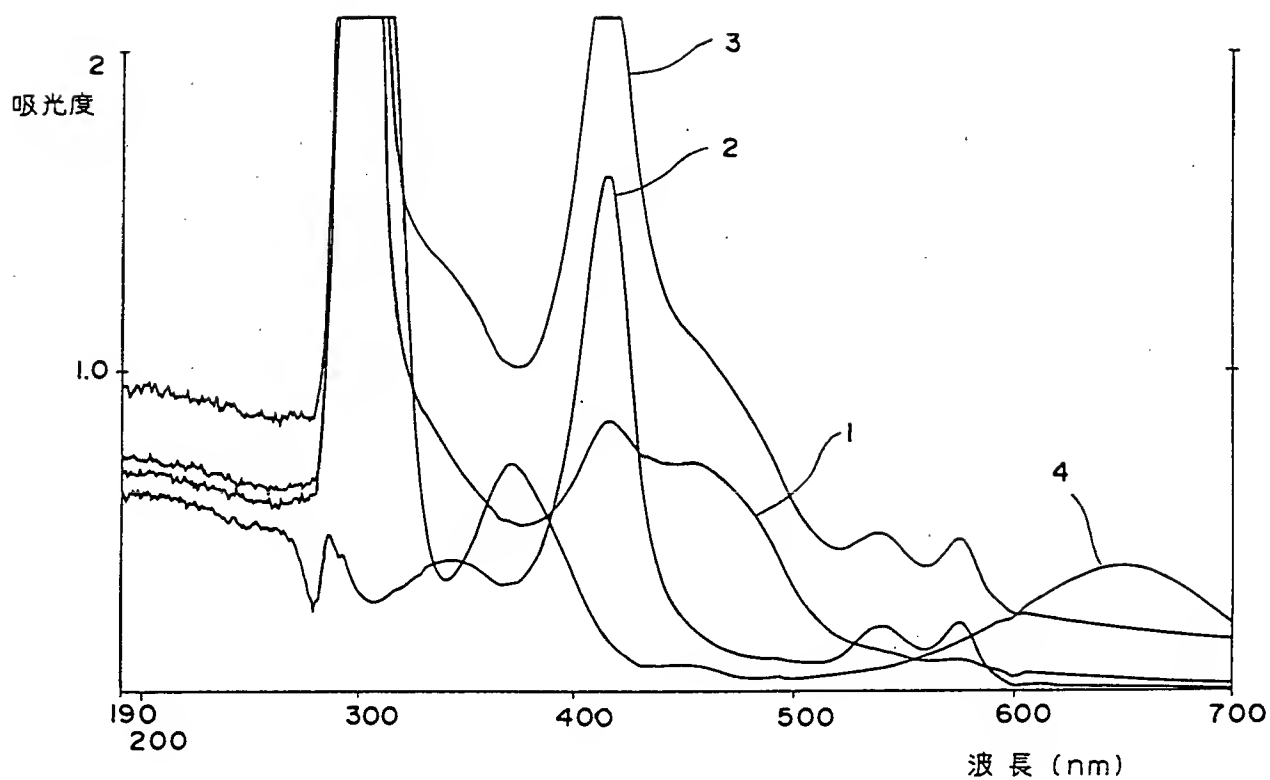
第 1 図及び第 2 図は、それぞれ本発明の比色分析に用いる特定波長を求めるための関連組成物の自動分光光度計による吸収曲線を示す図、及び第 3～第 7 図は、それぞれ順次実施例 1～5 に対応する本発明の定量法に用いられる検量線を示す図である。

— 15 —

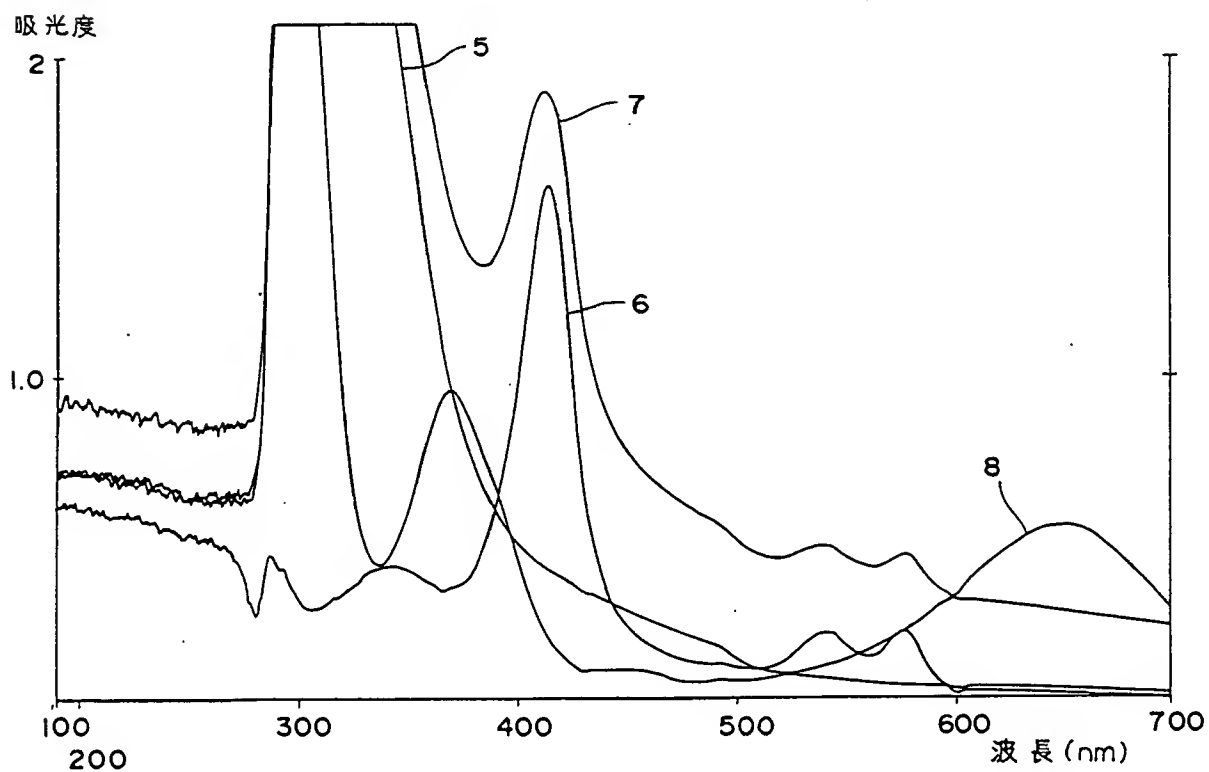
1…健康人の血漿、2…ヒトヘモグロビン、3…健康人血漿+ヒトヘモグロビン、4…被検人血漿 (含ヘモグロビン)+発色試薬、5…健康人尿、6…ヒトヘモグロビン、7…健康人尿+ヒトヘモグロビン、8…被検人尿 (含ヒトヘモグロビン)+発色試薬。

— 16 —

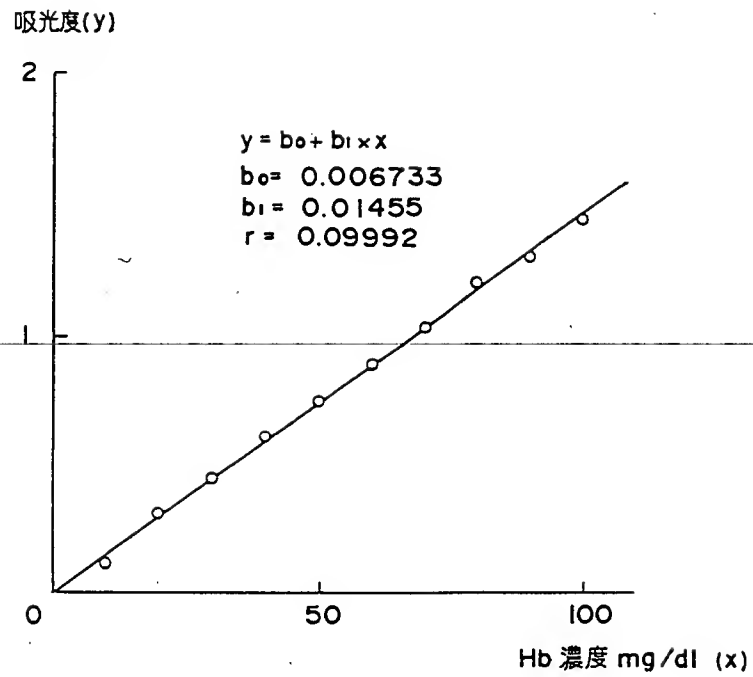
特許出願人 株式会社 ミドリ十字
代理人 弁理士 寺 崎 孝 一



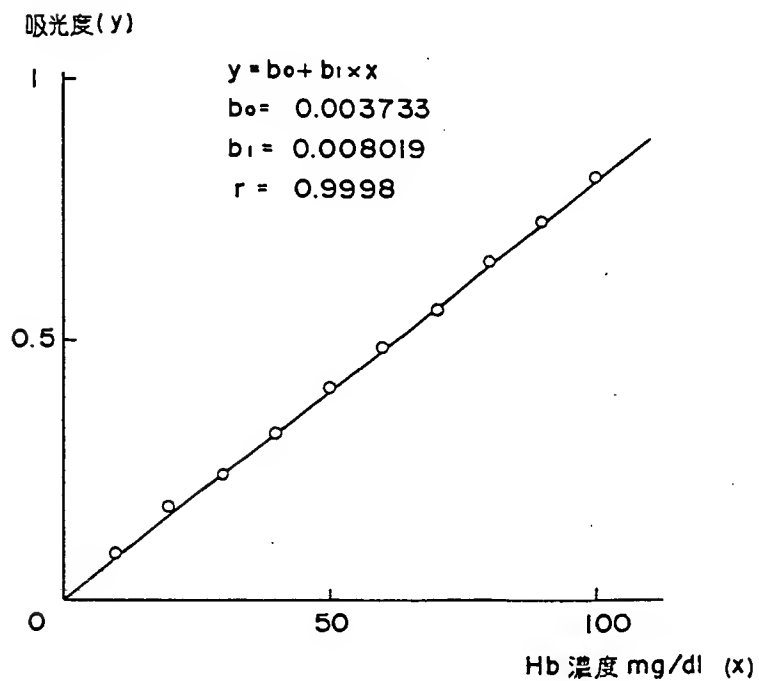
第 1 図



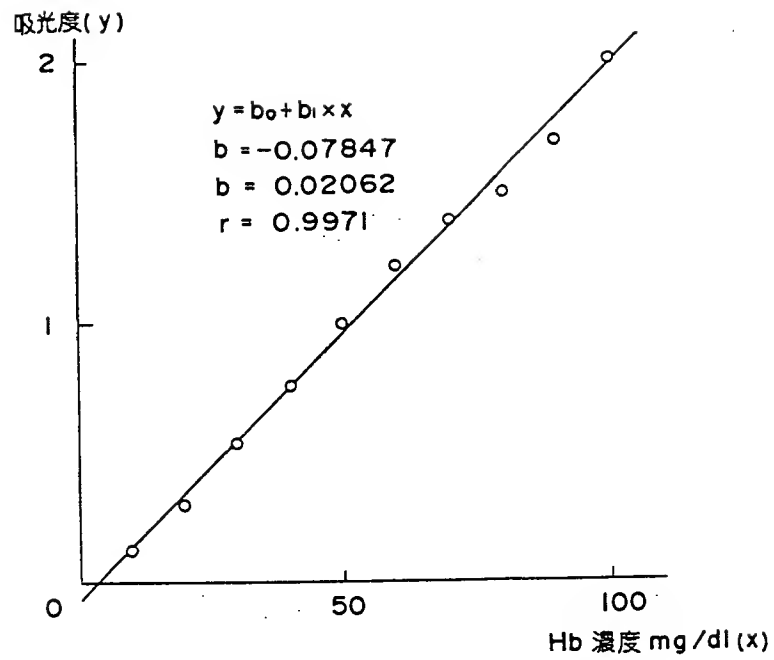
第 2 図



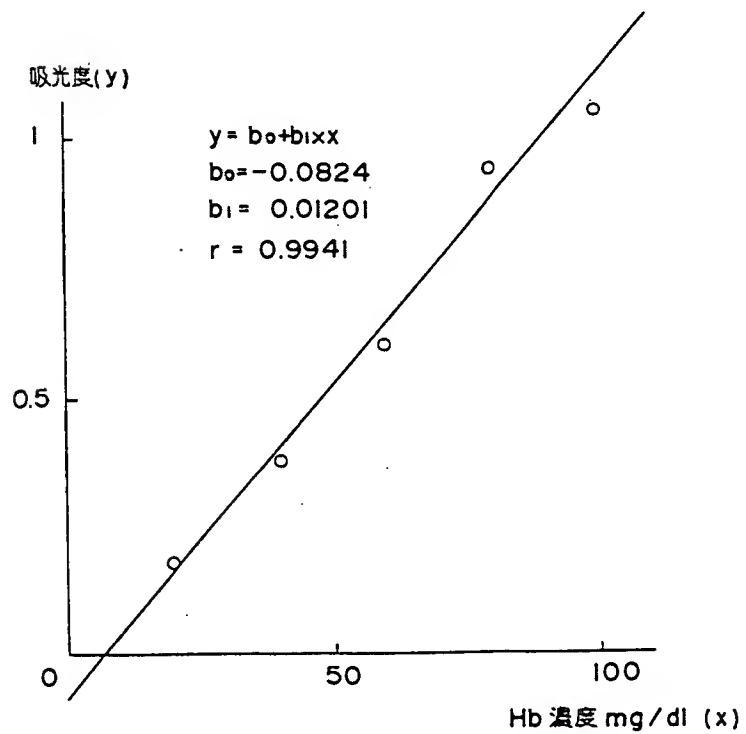
第 3 図



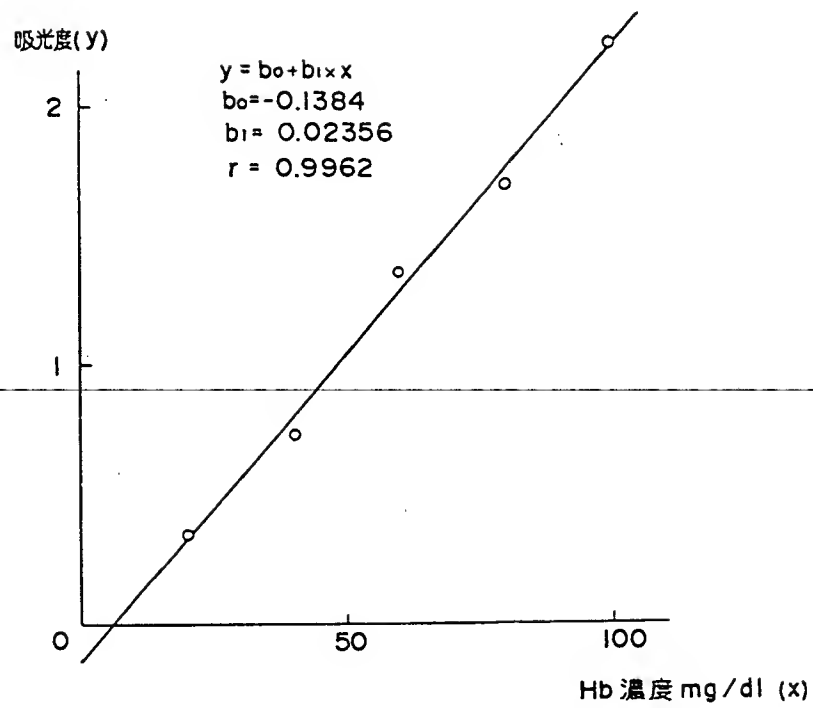
第 4 図



第 5 図



第 6 図



第 7 図

第 1 頁の続き

⑦発 明 者

永 友

緑

大阪府大阪市都島区都島中通 3 丁目 5 番 44 号 株式会社ミドリ十字都島工場内

